



Section 4
Effets sur la santé

Essai n° 460
Méthode d'essai de diffusion de
fluorescéine pour identifier les
substances corrosives et fortement
irritantes pour l'œil

4 juillet 2023

**Lignes directrices de l'OCDE pour
les essais de produits chimiques**

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Méthode d'essai de diffusion de fluorescéine pour identifier les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil

INTRODUCTION

1. La méthode d'essai de diffusion de fluorescéine (DF) est une méthode d'essai *in vitro* qui, dans certaines circonstances et assortie de restrictions spécifiques, peut être utilisée pour classer les produits chimiques (substances et mélanges) comme corrosifs et fortement irritants pour l'œil, au sens du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (catégorie 1), du règlement de l'Union européenne (UE) relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (CLP) (catégorie 1), et de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) (catégorie I) (1) (2) (3). Aux fins de la présente Ligne directrice pour les essais, les substances fortement irritantes sont définies comme des produits chimiques provoquant des lésions des tissus oculaires après application sur l'œil, lésions qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou qui entraînent une dégradation sévère de la vue, tandis que les substances corrosives pour l'œil occasionnent des lésions irréversibles des tissus oculaires. Ces substances sont classées dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis).

2. Bien que la méthode d'essai de DF n'ait pas été validée comme méthode substitutive complète à l'essai oculaire *in vivo* sur le lapin, elle est recommandée comme élément d'une stratégie d'essais à plusieurs niveaux à des fins de classification et d'étiquetage réglementaires. Le recours à la DF est en effet recommandé en phase initiale d'une approche « descendante » pour identifier les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil, en particulier pour certains types de produits chimiques (substances et mélanges hydrosolubles) (4) (5). Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette Ligne directrice doivent être envisagées dans le contexte du Document d'Orientation de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (10).

3. La(les) méthodes décrites dans la présente Ligne directrice ne peuvent pas être utilisées toute(s) seule(s) pour remplacer le test de Draize *in vivo* pour prédire la gamme complète de potentiel irritant pour les différentes classes de produits chimiques. Il est recommandé de recourir à l'utilisation de stratégies d'essai alternatives telles que celles décrites dans les Lignes directrices 467 et 492B pour couvrir la gamme complète de potentiel irritant. La combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test *in vivo* (5). L'approche « top-down » (5) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant.

4. Suivant le modèle prédictif détaillé au paragraphe 35, la méthode d'essai de DF permet, sans essai complémentaire, de classer les substances comme corrosives ou fortement irritantes pour l'œil dans un domaine d'applicabilité limité (catégorie 1 du SGH ; catégorie 1 du CLP ; catégorie I de l'EPA). On suppose que la méthode s'applique également aux mélanges bien qu'aucun mélange n'ait été utilisé pour la validation. La méthode d'essai de DF peut donc servir à identifier les substances chimiques irritantes/corrosives pour l'œil en suivant la stratégie d'essais séquentiels de la LD 405 (6). Toutefois, si un produit chimique n'est pas identifié comme corrosif ou fortement irritant pour l'œil à l'issue de l'essai de DF, il convient de le soumettre à une ou plusieurs autres méthodes d'essai (*in vitro* et/ou *in vivo*) capables d'identifier précisément i) les substances qui sont des faux négatifs pour les essais de DF *in vitro* visant à repérer les effets corrosifs/fortement irritants sur l'œil (catégorie 1 du SGH ; catégorie 1 du CLP ; catégorie I de l'EPA) ; ii) les substances non classées en ce qui concerne la corrosion/l'irritation oculaire (pas de catégorie dans le SGH ; pas de catégorie dans le CLP ; catégorie IV de l'EPA) ; et/ou iii) les substances modérément à légèrement irritantes pour l'œil (catégories 2A et 2B du SGH ; catégorie 2 du CLP ; catégories II et III de l'EPA).

5. L'objet de la présente Ligne directrice pour les essais est de décrire les procédures utilisées pour évaluer les éventuels effets corrosifs ou fortement irritants pour l'œil d'une substance d'essai au regard de sa capacité d'induire des lésions sur une monocouche épithéliale confluyente imperméable. L'intégrité de la perméabilité transépithéliale constitue une fonction primordiale d'un épithélium tel que celui présent dans la conjonctive et la cornée. La perméabilité transépithéliale est contrôlée par diverses jonctions serrées. Une corrélation a été démontrée entre l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium cornéen *in vivo* et la sévérité de l'inflammation et des lésions de la surface de l'œil observées dans le développement d'une irritation oculaire.

6. La méthode d'essai de DF permet de mesurer les effets toxiques induits après un court temps d'exposition à la substance d'essai en déterminant l'augmentation de la perméabilité à la fluorescéine-sodium à travers une monocouche épithéliale de cellules rénales de chien Madin-Darby (MDCK) cultivées sur des inserts perméables. La quantité de fluorescéine qui se diffuse est proportionnelle aux lésions provoquées par le produit chimique sur les jonctions serrées, les desmosomes et les cellules membranaires, et permet ainsi d'estimer sa toxicité potentielle pour l'œil. L'[annexe I](#) contient un diagramme représentant les cellules MDCK cultivées sur la membrane d'un insert pour la méthode d'essai de DF.

7. Les définitions utilisées sont données à l'[annexe II](#).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

8. La présente Ligne directrice pour les essais s'inspire du protocole INVITTOX n° 71 (7) qui a fait l'objet d'une évaluation dans le cadre d'une étude de validation internationale par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (CEVMA) (8), en collaboration avec le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) des États-Unis et avec le Centre japonais pour la validation de méthodes alternatives (JaCVAM).

9. La méthode d'essai de DF n'est pas recommandée pour identifier les produits chimiques qui devraient être classés comme légèrement à modérément irritants, ou ceux qui ne devraient pas être classés comme irritants pour l'œil (substances et mélanges) (qui relèvent des catégories 2A/2B ou d'aucune catégorie dans le SGH ; de la catégorie 2 ou d'aucune catégorie dans le CLP ; des catégories II, III et IV de l'EPA), comme l'a démontré l'étude de validation (4) (8).

10. La méthode d'essai ne s'applique qu'aux produits chimiques (substances et mélanges) hydrosolubles. Elle permet généralement de prévoir avec précision l'effet potentiel fortement irritant pour l'œil de produits chimiques qui sont hydrosolubles et/ou dont l'effet toxique n'est pas modifié par la dilution (8). Dans les conditions expérimentales, un produit chimique sera considéré comme hydrosoluble s'il est soluble dans une solution saline tamponnée de Hanks (HBSS) stérile avec calcium (à 1.0 – 1.8 mM) et sans rouge phénol, à une concentration supérieure ou égale à 250 mg/mL (soit une dose au-dessus de la valeur seuil fixée à 100 mg/mL). Néanmoins, si la substance d'essai est soluble à une concentration inférieure à 100 mg/mL, mais induit déjà une DF de 20 % à cette concentration (donc si $DF_{20} < 100$ mg/mL), elle peut quand même être classée dans la catégorie 1 du SGH ou de l'EPA.

11. Les acides et bases forts, les fixateurs cellulaires et les substances très volatiles sont hors des limites d'application mises en évidence pour cette méthode d'essai. Ces produits chimiques participent en effet à des mécanismes qui ne sont pas mesurés par la méthode de DF, par exemple coagulation extensive, saponification ou réactions chimiques spécifiques. Les résultats obtenus avec les substances d'essai colorées et visqueuses révèlent d'autres limites de la capacité de prévision de cette méthode (8). En effet, ces deux types de substances sont difficiles à éliminer de la monocouche après le court temps d'exposition, et il est suggéré que la qualité de prévision de la méthode d'essai pourrait être améliorée en augmentant le nombre d'étapes de lavage mises en œuvre. Par ailleurs, les produits chimiques solides en suspension dans un liquide ont tendance à précipiter, si bien qu'il peut être difficile de déterminer la concentration finale à laquelle sont exposées les cellules. Si l'on exclut de la base de données les substances relevant de ces classes chimiques et physiques, la précision de la méthode de DF au regard des systèmes de classification de l'UE, de l'EPA et de l'ONU se trouve considérablement améliorée (8).

12. Dans l'optique de la présente méthode d'essai (qui vise exclusivement à identifier les substances corrosives/fortement irritantes pour l'œil), les taux de faux négatifs (voir paragraphe 13) ne sont pas préoccupants car les substances concernées feront l'objet d'essais chez le lapin ou d'autres essais *in vitro* dûment validés, conformément aux exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve (6) (voir également les paragraphes 3 et 4).

13. La méthode d'essai de DF révèle d'autres limites à l'examen des taux de faux négatifs et faux positifs. Quand l'essai de DF est mis en œuvre en phase initiale d'une approche « top-down » pour identifier les substances et mélanges hydrosolubles corrosifs/fortement irritants pour l'œil (catégorie 1 du SGH ; catégorie 1 du CLP ; catégorie I de l'EPA), le taux de faux positifs est situé entre 7 % (7/103 ; SGH et CLP) et 9 % (9/99 ; EPA) et celui de faux négatifs entre 54 % (15/28 ; EPA) et 56 % (27/48 ; SGH et CLP), par rapport aux résultats obtenus *in vivo*. Les groupes de produits chimiques induisant des faux positifs et/ou des faux négatifs avec la méthode d'essai de DF ne sont pas définis dans le présent document.

14. Certaines limites techniques sont propres à la culture de cellules MDCK. Les jonctions serrées qui bloquent le passage du colorant (fluorescéine-sodium) à travers la monocouche baissent en qualité avec l'augmentation du nombre de repiquages des cultures. Or, la formation incomplète des jonctions serrées débouche sur une hausse de la diffusion de fluorescéine dans le témoin non traité. Il importe donc de définir un niveau de diffusion maximal admissible dans les témoins non traités (voir paragraphe 38 : diffusion de 0 %). Comme dans tous les essais *in vitro*, les cellules employées risquent de se transformer au fil du temps, c'est pourquoi il est crucial de préciser la fourchette du nombre de passages des essais.

15. Le domaine d'applicabilité actuel pourrait être étendu dans certains cas, mais seulement après analyse d'un ensemble élargi de données sur les substances à l'étude, données obtenues de préférence

lors d'essais (4). La présente Ligne directrice pour les essais sera mise à jour en conséquence, après l'examen de nouvelles informations et données.

16. Tout laboratoire qui fait appel au présent essai pour la première fois doit recourir aux substances d'épreuve de compétence indiquées à l'[annexe III](#). Les laboratoires peuvent utiliser ces substances pour apporter la preuve de leur compétence technique au regard de la mise en œuvre de la méthode d'essai de DF avant de soumettre les résultats des essais de DF à des fins de classification réglementaire dans une catégorie de danger.

PRINCIPE DE L'ESSAI

17. La méthode d'essai de DF est un essai *in vitro* fondé sur des paramètres de cytotoxicité et de fonctionnement cellulaire, réalisé sur une monocouche confluente de cellules épithéliales tubulaires MDCK CB997 cultivées sur des inserts semi-perméables et qui modélisent l'état non proliférant de l'épithélium cornéen *in vivo*. La lignée cellulaire MDCK est bien établie et forme des jonctions serrées et des desmosomes similaires à ceux que l'on observe sur la face apicale des épithéliums conjonctif et cornéen. *In vivo*, les jonctions serrées et les desmosomes empêchent les solutés et les substances exogènes de pénétrer l'épithélium cornéen. La perte d'imperméabilité transépithéliale, qui résulte de lésions des jonctions serrées et des desmosomes, est l'un des effets précoces de l'irritation oculaire d'origine chimique.

18. La substance d'essai est appliquée sur la couche confluente de cellules cultivées sur la face apicale de l'insert. Un temps d'exposition réduit, de 1 min, est généralement appliqué pour refléter la vitesse de clairance normalement associée aux expositions humaines. L'un des avantages d'une courte durée d'exposition est que les substances et mélanges aqueux peuvent être évalués purs, s'il est possible de les éliminer facilement à l'issue du temps d'exposition. Cette possibilité permet d'effectuer des comparaisons plus directes avec les effets chimiques chez l'être humain. La substance d'essai est ensuite éliminée et la fluorescéine-sodium, un colorant non toxique et très fluorescent, est ajoutée sur la face apicale de la monocouche pendant 30 minutes. Les lésions induites par la substance d'essai sur les jonctions serrées sont déterminées par la quantité de fluorescéine qui diffuse à travers la couche cellulaire pendant une durée définie.

19. La quantité de colorant (fluorescéine-sodium) qui a traversé la monocouche puis la membrane de l'insert et se retrouve dans un volume donné de solution du puits (où diffuse le colorant) est déterminée par mesure spectrofluorimétrique de la concentration de fluorescéine dans le puits. L'ampleur de la diffusion de fluorescéine (DF) est calculée par rapport aux intensités de fluorescence (IF) relevées pour deux témoins : un témoin à blanc et un témoin de la diffusion maximale. Le pourcentage de diffusion, et donc l'ampleur des lésions des jonctions serrées, est exprimé, par rapport à ces deux témoins, pour chacune des concentrations de la substance d'essai. On calcule alors la DF₂₀ (c'est-à-dire la concentration provoquant une DF égale à 20 % de la valeur relevée pour la monocouche confluente non exposée et les inserts sans cellules). La valeur de la DF₂₀ (mg/mL) est alors utilisée dans le modèle de prévision pour identifier les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil (voir paragraphe 35).

20. La capacité de récupération constitue un aspect important du profil toxicologique d'une substance d'essai, également évaluée dans l'essai d'irritation oculaire *in vivo*. Des analyses préliminaires indiquent que les données sur la récupération (jusqu'à 72 h après l'exposition chimique) sont susceptibles d'améliorer la capacité de prévision du protocole INVITTOX 71, mais d'autres évaluations s'imposent et nécessitent des données supplémentaires, obtenues de préférence lors d'essais complémentaires (7). La présente Ligne directrice pour les essais sera mise à jour en conséquence, après l'examen de nouvelles informations et données.

MODE OPÉRATOIRE

Préparation de la monocouche cellulaire

21. La monocouche de cellules MDCK CB997 est préparée avec des cellules sub-confluentes cultivées en fioles dans le milieu de Eagle modifié de Dulbecco/mélange nutritif F12 (concentré x 1 avec L-glutamine, HEPES à 15 mM, calcium à 1.0 – 1.8 mM, et 10 % de SVF/SBF désactivé à chaud). Il importe que tous les milieux et solutions employés au cours de l'essai de DF contiennent du calcium à une concentration située entre 1.0 mM (111 mg/L) et 1.8 mM (200 mg/L), pour garantir la formation et l'intégrité des jonctions serrées. La fourchette du nombre de repiquages de cellules doit faire l'objet d'un témoin pour assurer une formation régulière et reproductible des jonctions serrées. On privilégiera les cellules obtenues après 3 à 30 repiquages à partir de la décongélation, car les cultures situées dans cette plage présentent une fonctionnalité similaire, ce qui contribue à la reproductibilité des résultats de l'essai.

22. En amont de l'essai de DF, les cellules sont détachées de la fiole par trypsinisation et centrifugées, puis la quantité nécessaire de cellules est repiquée dans les inserts placés dans des plaques 24 puits (voir [annexe I](#)). Pour ce repiquage, on utilisera des inserts de 12 mm de diamètre équipés d'une membrane en esters cellulodiques mixtes de 80 à 150 µm d'épaisseur et percée de pores de 0.45 µm. L'étude de validation a été réalisée avec des inserts Millicell-HA 12 mm. Les propriétés de l'insert et du type de membrane sont importantes dans la mesure où elles peuvent modifier la croissance cellulaire et la formation de liaisons chimiques. Certains types de produits chimiques peuvent en effet se lier à la membrane de l'insert Millicell-HA, ce qui peut jouer sur l'interprétation des résultats. Il convient d'utiliser les substances d'épreuve de compétence (voir [annexe III](#)) pour démontrer l'équivalence d'autres membranes, le cas échéant.

23. La formation de liaisons chimiques avec la membrane de l'insert est plus courante avec les composés cationiques, comme le chlorure de benzalkonium, qui sont attirés par la membrane chargée positivement (8). Ces liaisons chimiques sont susceptibles de prolonger le temps d'exposition à la substance étudiée, et d'entraîner ainsi une surestimation de sa toxicité potentielle ; elles peuvent aussi limiter physiquement la diffusion de fluorescéine à travers l'insert, en liant le colorant au composé cationique lui-même lié à la membrane, ce qui donne lieu à une sous-estimation de la toxicité potentielle de la substance d'essai. On peut évaluer ce phénomène directement en exposant la membrane seule à la concentration maximale de la substance testée, puis en ajoutant le colorant fluorescéine-sodium à la concentration normale et pendant le temps d'exposition standard (pas de témoins des cellules). Si la fluorescéine se lie à la membrane de l'insert, celle-ci paraît jaunie une fois que la substance d'essai a été éliminée par lavage. Il est donc essentiel de connaître les affinités de liaison de la substance d'essai afin de pouvoir interpréter son effet sur les cellules.

24. Le repiquage des cellules sur les inserts doit permettre d'obtenir une monocouche confluyente au moment de l'exposition chimique. On ajoute 1.6×10^5 cellules par insert (400 µL de suspension cellulaire avec une densité de 4×10^5 cellules/mL). Dans ces conditions, une monocouche confluyente apparaît généralement après 96 heures de culture. Il convient d'examiner visuellement les inserts avant le repiquage, pour s'assurer que les lésions éventuellement consignées à l'occasion de la vérification visuelle décrite au paragraphe 30 découlent de la manipulation.

25. Les cultures de cellules MDCK sont maintenues dans des incubateurs en atmosphère humidifiée, à 5 ± 1 % de CO₂ et 37 ± 1 °C. Les cellules sont exemptes de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque ou fongique.

Application des substances d'essai et témoins

26. Une nouvelle solution-mère de la substance à tester doit être préparée pour chaque série d'essai et utilisée dans les 30 minutes qui suivent sa préparation. Les substances d'essai sont préparées dans le HBSS avec calcium (à 1.0 – 1.8 mM) et sans rouge phénol, pour éviter les liaisons avec les protéines sériques. La

solubilité du produit chimique à 250 mg/mL est évaluée avant l'essai. Si, à cette concentration, il forme une suspension ou une émulsion stable (c'est-à-dire qui reste uniforme et ne décante pas ou ne se sépare pas en plusieurs phases) pendant 30 minutes, on peut maintenir le choix du HBSS comme solvant. Néanmoins, si la substance s'avère insoluble dans le HBSS à cette concentration, on envisagera de recourir à d'autres méthodes que l'essai de DF. La prudence est de mise concernant l'utilisation d'une huile minérale légère comme solvant, dans les cas où le produit chimique se révèle insoluble dans le HBSS, car les données accessibles sont insuffisantes pour conclure sur la performance de l'essai de DF dans ces conditions.

27. Tous les produits chimiques à évaluer sont préparés à partir de la solution-mère, dans du HBSS stérile avec calcium (à une concentration de 1.0 – 1.8 mM) et sans rouge phénol, en cinq dilutions dont les concentrations massiques sont fixées : 1, 25, 100 et 250 mg/mL ainsi qu'une solution pure ou saturée. En cas d'évaluation d'un composé solide, on inclura une très forte concentration de 750 mg/mL. Cette concentration de la substance d'essai doit parfois être appliquée sur les cellules à l'aide d'une pipette à déplacement positif. Si des effets toxiques apparaissent entre 25 et 100 mg/mL, il convient d'analyser également les concentrations suivantes à deux reprises : 1, 25, 50, 75 et 100 mg/mL. La DF_{20} sera déduite de ces concentrations, à condition que les critères d'acceptation soient satisfaits.

28. Avant d'appliquer les substances d'essai sur les monocouches de cellules confluentes, le milieu de culture cellulaire est retiré et les monocouches sont lavées deux fois avec du HBSS stérile avec calcium (à 1.0 – 1.8 mM) et sans rouge phénol amené à 37 °C. On aura préalablement effectué une vérification visuelle des filtres à la recherche d'éventuelles lésions déjà présentes et qui pourraient être faussement imputées à une incompatibilité potentielle avec la substance d'essai. Pour chaque concentration de la substance d'essai et pour les témoins, on met en œuvre au moins trois réplicats par série d'essai. Après 1 min d'exposition à température ambiante, la substance d'essai est soigneusement éliminée par pipetage, la monocouche est lavée deux fois avec du HBSS stérile amené à 37 °C avec calcium (à 1.0 – 1.8 mM) et sans rouge phénol, et la diffusion de fluorescéine est immédiatement quantifiée.

29. Les témoins concurrents négatifs (TN) et positifs (TP) sont présents dans chaque série d'essai pour démontrer que l'intégrité de la monocouche (TN) et la sensibilité des cellules (TP) sont dans une fourchette admissible, définie d'après les résultats historiques. Le composé recommandé comme TP est le Brij 35 (no CAS 9002-92-0) à 100 mg/mL. Cette concentration devrait induire environ 30 % de diffusion de fluorescéine (plage admissible : 20 – 40 % de DF, donc de lésions de la couche cellulaire). Le composé recommandé comme TN est le HBSS avec calcium (à 1.0 – 1.8 mM) et sans rouge phénol (témoin à blanc non traité). Un témoin de la diffusion maximale est également inclus dans chaque série d'essai pour permettre de calculer les DF_{20} . La diffusion maximale est déterminée à l'aide d'un insert témoin ne contenant pas de cellules.

Détermination de la perméabilité à la fluorescéine

30. Immédiatement après avoir retiré les substances d'essai et témoins, ajouter aux inserts Millicell-HA 400 µL de solution de fluorescéine-sodium à 0.1 mg/mL (soit 0.01 % en m/v dans du HBSS avec calcium [à 1.0 – 1.8 mM] et sans rouge phénol). Les cultures sont maintenues à température ambiante pendant 30 minutes. À l'issue de l'incubation avec la fluorescéine, les inserts sont délicatement retirés de tous les puits. On effectue une vérification visuelle de chaque filtre, et toute lésion éventuellement causée par la manipulation est consignée.

31. La quantité de fluorescéine diffusée à travers la monocouche et l'insert est mesurée dans la solution qui reste dans les puits après le retrait des inserts. Ces mesures sont effectuées avec un spectrofluorimètre à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 485 nm et 530 nm, respectivement. Il convient de régler la sensibilité du spectrofluorimètre de façon à obtenir une différence de valeur aussi large que possible entre la DF maximale (insert sans cellules) et la DF minimale (insert contenant la monocouche confluente traitée avec le TN). En raison des différences entre les spectrofluorimètres employés, il est suggéré de fixer la sensibilité de manière à obtenir une intensité de fluorescence > 4 000 pour le témoin de la diffusion

maximale de fluorescéine. La valeur correspondant à la DF maximale ne doit pas dépasser 9 999. L'intensité de fluorescence correspondant à la diffusion maximale doit rester comprise dans la fourchette de fonctionnement linéaire du spectrofluorimètre utilisé.

Interprétation des résultats et modèle de prévision

32. La quantité de DF est proportionnelle aux lésions induites par la substance d'essai sur les jonctions serrées. Le pourcentage de DF pour chaque concentration de la substance évaluée est calculé à partir des DF obtenues pour cette substance en fonction des DF correspondant au TN (relevées pour la monocouche confluyente de cellules traitées avec le TN) et au témoin de la diffusion maximale (relevés de la quantité de DF à travers un insert dépourvu de cellules).

Valeur moyenne de l'intensité de fluorescence de la diffusion maximale = x
 Valeur moyenne de l'intensité de fluorescence pour une diffusion de 0 % (TN) = y
 La diffusion de 100 % moyenne est calculée en soustrayant la diffusion de 0 % moyenne de la diffusion maximale moyenne,
 soit $x - y = z$

33. On calcule le pourcentage de diffusion pour chaque dose fixée en soustrayant la diffusion de 0 % de la moyenne des intensités de fluorescence relevées pour les trois réplicats (m), puis en divisant la valeur obtenue par la diffusion de 100 %, soit $\%DF = [(m - y) / z] \times 100 \%$, où :

m = intensité de fluorescence moyenne des trois réplicats de la concentration concernée
 %DF = pourcentage de fluorescéine qui se diffuse à travers la couche cellulaire

34. On applique l'équation suivante pour calculer la concentration de produit chimique induisant une DF de 20 % :

$$DF_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

Où :
 D = % d'inhibition
 A = % de lésions (20 % de diffusion de fluorescéine)
 B = % de diffusion de fluorescéine < A
 C = % de diffusion de fluorescéine > A
 M_C = concentration (mg/mL) de C
 M_B = concentration (mg/mL) de B

35. La valeur seuil de la DF₂₀ permettant de prévoir que les produits chimiques sont corrosifs/fortement irritants pour l'œil est indiquée ci-dessous :

DF ₂₀ (mg/mL)	C&E du SGH (ONU)	C&E du CLP (UE)	C&E de l'EPA (États-Unis)
≤ 100	Catégorie 1	Catégorie 1	Catégorie I

C&E : système de classification et d'étiquetage

36. La méthode d'essai de DF est recommandée exclusivement pour l'identification des substances hydrosolubles corrosives ou fortement irritantes pour l'œil (catégorie 1 du SGH, catégorie 1 du CLP, catégorie I de l'EPA) (voir paragraphes 1 et 10).

37. Pour qu'un produit chimique (substance ou mélange) hydrosoluble (4) (7) (8) soit classé comme provoquant des « lésions oculaires graves » (catégorie 1 du SGH et du CLP) ou comme « corrosif ou fortement irritant pour l'œil » (catégorie I de l'EPA), il faut que la substance d'essai induise une $DF_{20} \leq 100$ mg/mL.

Acceptation des résultats

38. La valeur moyenne de la diffusion maximale de fluorescéine (x) doit dépasser 4 000 (voir paragraphe 31), la moyenne de la diffusion de 0 % (y) doit être inférieure ou égale à 300, et la moyenne de la diffusion de 100 % (z) doit tomber entre 3 700 et 6 000.

39. Un essai est considéré comme acceptable si le témoin positif provoque des lésions sur 20 à 40 % de la couche de cellules (déterminées en % de diffusion de fluorescéine).

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

40. Pour chaque série, les données des puits correspondant à chaque réplicat (par exemple les intensités de fluorescence et les pourcentages de DF calculés pour chaque substance d'essai, y compris leur classification) sont présentées sous forme de tableau. Il convient en outre de rapporter les moyennes \pm écart-type des mesures correspondant à chaque réplicat pour chaque série d'essais.

Rapport d'essai

41. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Substances d'essai et témoins

- nom(s) chimique(s), par exemple nom de la structure chimique utilisé par le Chemical Abstracts Service (CAS), suivi d'autres noms, s'ils sont connus ;
- numéro CAS du produit chimique, s'il est connu ;
- pureté et composition de la substance ou du mélange (en pourcentage pondéral), dans la mesure où cette information est disponible ;
- propriétés physico-chimiques utiles à la conduite de l'étude (par ex. état physique, volatilité, pH, stabilité, hydrosolubilité, classe chimique) ;
- le cas échéant, traitement des substances d'essai et témoins avant l'essai, (par ex. chauffage, broyage) ;
- conditions de stockage ;

Justification de la méthode d'essai et du protocole utilisés

- considérations relatives au domaine d'applicabilité et aux limites de la méthode d'essai ;

Conditions d'essai

- description du système cellulaire utilisé, y compris le certificat d'authenticité et le statut mycoplasmique de la lignée cellulaire ;
- détails du mode opératoire utilisé ;
- concentration(s) de la substance d'essai utilisée(s) ;
- durée de l'exposition à la substance d'essai ;

- durée de l'incubation avec la fluorescéine ;
- description de toutes les modifications du mode opératoire ;
- description des critères d'évaluation utilisés ;
- référence aux données historiques du modèle (par ex. témoins négatifs et positifs, substances de référence, le cas échéant) ;
- informations sur la compétence technique démontrée par le laboratoire ;

Résultats

- tableau présentant les données pour chaque substance d'essai, chaque témoin, chaque série d'essai et chaque réplicat (y compris les résultats individuels, les moyennes et les écarts-types) ;
- classification(s) déduite(s) et modèle de prévision et/ou critères de décision employés ;
- description des autres effets observés ;

Discussion des résultats

- considérations relatives aux résultats non probants (paragraphe 35 : $DF_{20} > 100$ mg/mL) et aux essais supplémentaires ;

Conclusions

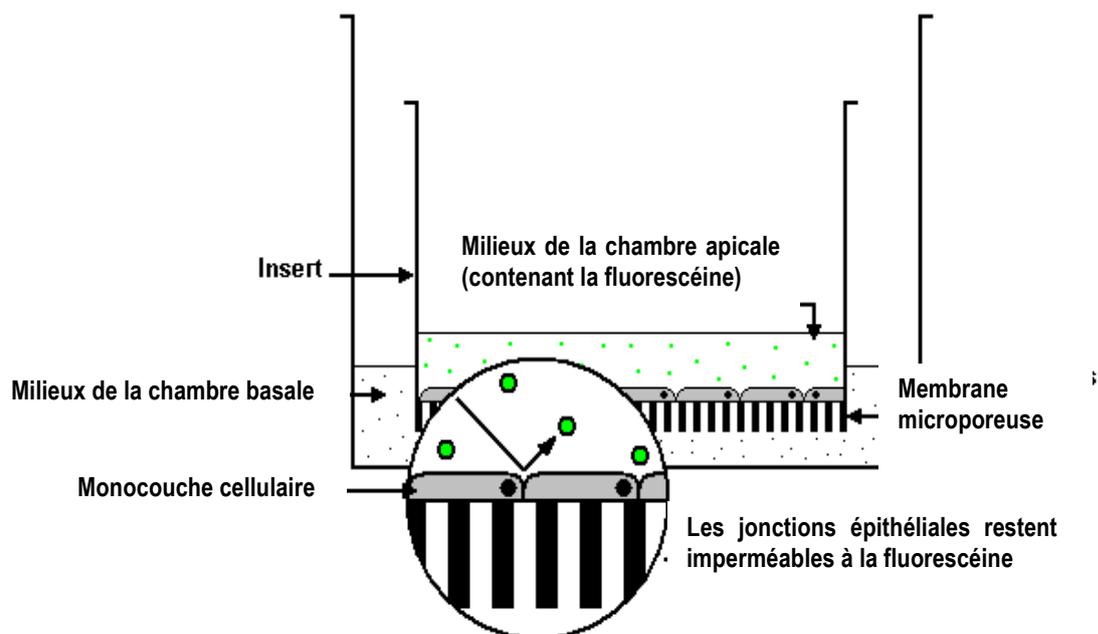
BIBLIOGRAPHIE

1. ONU (2009), Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH), Troisième édition révisée, New York & Genève : Publications des Nations Unies. ISBN : 978-92-1-216509-7. Consultable à l'adresse : [\[http://live.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_f.html\]](http://live.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_f.html)
2. CE (2008), Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, Journal Officiel des Communautés Européennes L353, 1-1355.
3. U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC : Agence de protection de l'environnement des États-Unis.
4. CEVMA (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing. Consultable sous la rubrique *Publications* à l'adresse : [\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](http://ecvam.jrc.it/index.htm)
5. Scott, L. et autres (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
6. OCDE (2002), *Essai n° 405 : Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux*, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, section 4, éditions OCDE. doi : [10.1787/9789264070653-fr](https://doi.org/10.1787/9789264070653-fr)
7. CEVMA (1999), protocole INVITTOX 71 : Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italie : Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (CEVMA). Consultable à l'adresse : [\[http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu\]](http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu)
8. CEVMA (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing. Consultable sous la rubrique *Validation Study Documents*, section *Eye Irritation*, à l'adresse : [\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](http://ecvam.jrc.it/index.htm)
9. OCDE (2005), *Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment*, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations n° 34. OCDE, Paris. Disponible en anglais à l'adresse suivante : [\[http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices\]](http://www.oecd.org/env/lignesdirectrices)

10. OECD (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No.2XX. ENV Publications, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

ANNEXE I : DIAGRAMME REPRÉSENTANT LES CELLULES MDCK CULTIVÉES SUR LA MEMBRANE D'UN INSERT POUR LA MÉTHODE D'ESSAI DE DF

On cultive une couche confluente de cellules MDCK sur la membrane semi-perméable d'un insert. Les inserts sont placés dans les puits de plaques 24 puits.



Graphique tiré de : Wilkinson, P.J. (2006) Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure. Thèse de doctorat, Université de Nottingham, Royaume-Uni.

ANNEXE II : DÉFINITIONS

Catégorie 1 de l'EPA : produits chimiques induisant un effet corrosif (destruction irréversible des tissus oculaires) ou des complications cornéennes ou une irritation persistant plus de 21 jours (1).

Catégorie 1 du SGH : lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'une substance d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application.

CLP de l'UE (Règlement de la Commission européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges) : vise la mise en œuvre dans l'Union européenne (UE) du SGH de l'ONU pour la classification des produits chimiques (substances et mélanges) (3).

Danger : propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

DF₂₀ : peut être estimée en déterminant la concentration à laquelle la substance d'essai induit 20 % de diffusion de fluorescéine à travers la couche de cellules.

Diffusion de fluorescéine : quantité de fluorescéine qui traverse la couche cellulaire, mesurée par spectrofluorimétrie.

Essai substitutif : essai conçu pour remplacer un autre essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou l'évaluation des risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et substances d'essai possibles.

Fiabilité : mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire.

Lésion oculaire grave : lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'une substance d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application.

Mélange : dans le contexte du SGH ONU (2), désigne un mélange ou une solution composé(e) de deux substances ou plus qui n'interagissent pas.

Méthode d'essai validée : méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (9).

Non classé : produit chimique qui n'est pas classé comme irritant oculaire au sens des

catégories 1, 2A, ou 2B du SGH (ONU) ; des catégories 1 ou 2 du CLP (UE) ; ou des catégories I, II et III de l'EPA (États-Unis) (2) (3) (4).

Pertinence : description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (9).

Poids de la preuve : prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'une substance chimique et d'étayer cette conclusion.

Précision : degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un de ses aspects de pertinence. Le terme est souvent utilisé indifféremment avec le terme « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

Sensibilité : proportion des substances positives/actives correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (ONU)] : système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (2).

Spécificité : proportion des substances négatives/inactives qui sont correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai.

Stratégie d'essais à plusieurs niveaux : démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur une substance d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve pour déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'une substance d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Substance : dans le contexte du SGH de l'ONU, désigne un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni

modifier la composition.

Substance corrosive pour l'œil : (a) substance provoquant des lésions irréversibles des tissus oculaires. (b) substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis) (2) (3) (4).

Substance d'épreuve de compétence : substance de la liste des produits chimiques de référence qu'un laboratoire peut employer pour démontrer sa compétence à mettre en œuvre la méthode d'essai de référence validée, s'il ne l'a encore jamais utilisée.

Substance fortement irritante pour l'œil : (a) substance provoquant des lésions des tissus oculaires suite à une application sur la face antérieure de l'œil, qui ne sont pas réversibles dans les 21 jours suivant l'application ou entraînent une dégradation sévère de la vue ; (b) substance classée comme irritant oculaire dans la catégorie 1 du SGH (ONU), la catégorie 1 du CLP (UE) ou la catégorie I de l'EPA (États-Unis) (2) (3) (4).

Substance irritante pour l'œil : (a) substance provoquant une modification réversible de l'œil suite à une application sur la face antérieure de l'œil ; (b) substance classée comme irritant oculaire dans les catégories 2A ou 2B du SGH (ONU), la catégorie 2 du CLP (UE) ou les catégories II ou III de l'EPA (États-Unis) (2) (3) (4).

Taux de faux négatifs : proportion de tous les produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs : proportion de tous les produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Témoin de solvant/véhicule : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins traités ou non avec la substance d'essai afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec la substance d'essai dissoute dans le même solvant ou véhicule. Testé avec un témoin négatif concurrent, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Témoin négatif : réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance d'essai et les autres échantillons témoins afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Témoin positif : réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai et traité avec un produit chimique induisant notoirement une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

ANNEXE III : SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE POUR LA MÉTHODE D'ESSAI DE DF

Avant d'utiliser en routine une méthode d'essai conforme à la présente Ligne directrice pour les essais, les laboratoires démontrent leurs compétences techniques en déterminant correctement la catégorie de corrosivité oculaire des 8 substances chimiques recommandées dans le tableau 1. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réactions locales d'irritation/de corrosion oculaire, sur la base des résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (LD 405) (c'est-à-dire les catégories 1, 2A, 2B, ou Non classé du SGH de l'ONU et du CLP de l'UE) (1) (2) (6). Toutefois, compte tenu de l'utilité validée de ces essais (pour identifier uniquement les substances corrosives/fortement irritantes pour l'œil), seuls deux résultats expérimentaux obtenus à des fins de classification (substance corrosive/fortement irritante ou substance non corrosive/non sévèrement irritante) permettent de démontrer les compétences des laboratoires. Les autres critères de sélection retenus ont trait à la disponibilité des substances dans le commerce, à la disponibilité de données de référence *in vivo* de bonne qualité, et à l'existence de données de bonne qualité obtenues par la méthode d'essai de DF. C'est pourquoi les substances d'épreuve de compétence choisies sont issues du « Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing » (8), qui a servi à la validation rétrospective de la méthode d'essai de DF.

Tableau 1 : Substances recommandées pour démontrer la compétence technique des laboratoires au regard de l'essai de DF

Produit chimique	N° CAS	Classe chimique ¹	Forme physique	Classification <i>in vivo</i> ²	Classification <i>in vitro</i> ³
Chlorure de benzalkonium (5 %)	8001-54-5	Composé onium	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Hydrochlorure de prométhazine	58-33-3	Amine/amidine, hétérocyclique, composé organo-sulfuré	Solide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Hydroxyde de sodium (10 %)	1310-73-2	Base	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
Laurylsulfate de sodium (15 %)	151-21-3	Acide carboxylique (sel)	Liquide	Catégorie 1	Corrosif/fortement irritant
4-carboxy-benzaldéhyde	619-66-9	Acide carboxylique, aldéhyde	Solide	Catégorie 2(A)	Non corrosif/faiblement irritant
Nitrate d'ammonium	6484-52-2	Sel inorganique	Solide	Catégorie 2(A)	Non corrosif/faiblement irritant
2-méthylacéto-acétate d'éthyle	609-14-3	Cétone, ester	Liquide	Catégorie 2(B)	Non corrosif/faiblement irritant
Glycérol	56-81-5	Alcool	Liquide	Aucune catégorie	Non corrosif/faiblement irritant

Abréviations : N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

¹Les classes de produits chimiques ont été attribuées à chaque substance d'essai à l'aide d'un système de classification normalisé, fondé sur le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible sur <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

²D'après les résultats de l'essai *in vivo* sur œil de lapin (Ligne directrice de l'OCDE n° 405) et en utilisant le SGH (ONU) et le CLP de l'UE (1) (2) (6).

³D'après les résultats obtenus avec l'essai de DF (Protocole INVITTOX n° 71).